

RZECZPOSPOLITA
POLSKAUrząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

⑫ OPIS PATENTOWY ⑲ PL ⑪ 177372

⑬ B1

⑳ Numer zgłoszenia: 307917

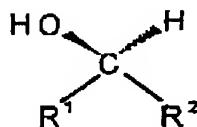
⑤① IntCl⁶:
C07C 37/00

㉔ Data zgłoszenia: 30.03.1995

⑤④ Sposób otrzymywania optycznie czynnych alkoholi aromatycznych

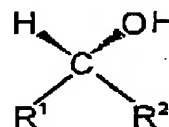
④③ Zgłoszenie ogłoszono:
18.09.1995 BUP 19/95⑦③ Uprawniony z patentu:
Akademia Rolnicza, Wrocław, PL④⑤ O udzieleniu patentu ogłoszono:
30.11.1999 WUP 11/99⑦② Twórcy wynalazku:
Bogdan Jarosz, Wrocław, PL
Antoni Siewiński, Wrocław, PL

⑤⑦ 1. Sposób otrzymywania optycznie czynnych alkoholi aromatycznych stanowiących mieszaninę enancjomeryczną, z przewagą jednego z enancjomerów, o wzorach ogólnych 2.A i 2.B, gdzie R¹ i R² oznaczają grupę aryłową i alkilową lub dwie grupy aryłowe, drogą biotransformacji z wykorzystaniem kultury mikroorganizmu namnożonego na sterylnej pożywce płynnej, znamienny tym, że do enancjospicyficznej redukcji substratu, którym są prochiralne ketony o wzorze ogólnym 1, gdzie R¹ i R² oznaczają grupy aryłową i alkilową lub dwie grupy aryłowe, stosuje się gatunek *Nigrospora oryzae*.



Wzór 2.A

+



Wzór 2.B

PL 177372 B1

BEST AVAILABLE COPY

Sposób otrzymywania optycznie czynnych alkoholi aromatycznych

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania optycznie czynnych alkoholi aromatycznych stanowiących mieszaninę enancjomeryczną, z przewagą jednego z enancjomerów, o wzorach ogólnych 2.A i 2.B, gdzie R^1 i R^2 oznaczają grupę aryłową i alkilową lub dwie grupy aryłowe, drogą biotransformacji z wykorzystaniem kultury mikroorganizmu namnożonego na sterylnej pożywce płynnej, znamienny tym, że do enancjosecypicyficznej redukcji substratu, którym są prochiralne ketony o wzorze ogólnym 1, gdzie R^1 i R^2 oznaczają grupy aryłową i alkilową lub dwie grupy aryłowe, stosuje się gatunek *Nigrospora oryzae*.

2. Sposób według zastrz. 1, znamienny tym, że prochiralnymi ketonami są ketony typu aromatycznego posiadające jedną lub dwie grupy aromatyczne, w tym aromatyczne układy heterocykliczne z azotem w pierścieniu sześcioczłonowym albo siarką w pierścieniu pięcioczłonowym, jako jedynym heteroatomem pierścienia.

3. Sposób według zastrz. 1, znamienny tym, że stężenie ketonu w stosunku do kultury mikroorganizmu, namnożonej na sterylnej pożywce płynnej zawierającej 2,5% ekstraktu maltozowego, wynosi od 0,1 do 3,0 g/dm³.

* * *

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania optycznie czynnych alkoholi, o wzorach ogólnych 2.A i 2.B, z przewagą jednego z enancjomerów.

Znane są sposoby otrzymywania optycznie czynnych alkoholi na drodze biotransformacji z wykorzystaniem systemów enzymatycznych drobnoustrojów (A. Siewiński, Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. sci. chim. 17, 475, 1969 oraz G. Fantin, M. Fogagnolo, A. Medici, P. Pedrini, S. Poli, Tetrahedron: Asymmetry 4, 1607, 1993). W wyżej wymienionych przypadkach otrzymywano alkohole homo- i heteroaromatyczne z odpowiednich prochiralnych ketonów, przy czym biotransformację prowadzono przy użyciu kultur drobnoustrojów *Rhodotorula mucilaginosa* i *Bacillus stearothermophilus*.

Znane są też sposoby otrzymywania optycznie czynnych alkoholi aromatycznych (patenty PL 144 393, 144 395), w których do biotransformacji wykorzystywane są całe rośliny *Spirodela oligorrhiza*. System enzymatyczny tej rośliny hydrolizuje enancjosecypicyficznie estry racemicznych alkoholi aromatycznych do alkoholi optycznie czynnych.

Optycznie czynne alkohole otrzymać można też na drodze chemicznej przez redukcję prochiralnych ketonów aromatycznych (A. Hirao, S. Itsuno, S. Nakahama, N. Yamazaki - Journal of the Chemical Society. Chemical Communications, 1981, 315; S. Itsuno, K. Ito, A. Hirao, S. Nakahama - Journal of the Chemical Society. Chemical Communications, 1983, 469).

Celem wynalazku jest wykorzystanie systemu enzymatycznego szczepu gatunku *Nigrospora oryzae* do enancjosecypicyficznej redukcji prochiralnych ketonów.

Sposób według wynalazku polega na wprowadzaniu do kultury płynnej mikroorganizmu *Nigrospora oryzae*, namnożonej na sterylnej pożywce płynnej, substratu w postaci prochiralnego ketonu, o wzorze ogólnym 1. Pod działaniem systemu enzymatycznego kultury *Nigrospora oryzae* następuje enancjosecypicyficzna redukcja grupy karbonylowej prochiralnego ketonu do optycznie czynnego alkoholu. Stanowi on mieszaninę enancjomeryczną, z przewagą jednego z enancjomerów, o wzorze ogólnym 2.A i 2.B, gdzie R^1 i R^2 oznaczają grupy: aryłową i alkilową lub dwie grupy aryłowe.

Korzystnie jest gdy prochiralnymi ketonami są ketony typu aromatycznego posiadające jedną lub dwie grupy aromatyczne, w tym aromatyczne układy heterocykliczne z azotem w pierścieniu sześcioczłonowym albo siarką w pierścieniu pięcioczłonowym, jako jedynym

heteroatomem pierścienia. Korzystnie też jest gdy stężenie ketonu w stosunku do kultury drobnoustroju, namnożonej na sterylnej pożywce płynnej zawierającej 2,5% ekstraktu maltozowego, wynosi od 0,1 do 3,0 g/dm³. Korzystnie też jest gdy substrat, który jest trudno rozpuszczalny w roztworze wodnym, w celu jego lepszego rozproszenia w namnożonej kulturze mikroorganizmu, najpierw rozpuszcza się w niewielkiej ilości rozpuszczalnika organicznego takiego jak np. etanol, izopropanol lub aceton.

W sposobie według wynalazku układ enzymatyczny *Nigrospora oryzae* redukuje enancjospetycznie substrat, którym jest prochiralny keton o wzorze ogólnym 1, do optycznie czynnej mieszaniny enancjomerycznej alkoholi, o wzorze ogólnym 2.A i 2.B, z przewagą jednego z enancjomerów. Z przedstawionych poniżej 12-stu przykładów wykonania, w 9-ciu przypadkach jest to enancjomer o konfiguracji absolutnej „S” (alkohole o wzorach 4.A - 20.A) i znaku skręcalności optycznej (-), w trzech przypadkach - enancjomer R (alkohole 22.B - 26.B).

Po zakończeniu transformacji, trwającej od 4 do 20 dni w temperaturze 25 - 30°C przy stałym wstrząsaniu z częstotnością około 1 s⁻¹, przeprowadza się ekstrakcję mieszaniny poreakcyjnej za pomocą rozpuszczalnika organicznego, np. chloroformu, chlorku metylenu, octanu etylu lub innego nie mieszającego się z wodą. Po kilkakrotnej ekstrakcji, połączone ekstrakty suszy się a następnie odparowuje. Uzyskaną mieszaninę, zawierającą optycznie czynne alkohole, ewentualnie część nieprzereagowanego substratu oraz niewielką ilość metabolitów własnych *Nigrospora oryzae*, rozdziela się w chromatografii kolumnowej. W ten sposób otrzymuje się optycznie czynne alkohole z wydajnością preparatywną od 15 do 79% i o czystości optycznej od 5 do prawie 100%. Strukturę otrzymanych alkoholi oznacza się spektralnie lub przez porównanie, w chromatografii gazowej, ich sygnałów z sygnałami wzorcowych alkoholi, na kolumnach z wypełnieniami chiralnymi, jak Chrompack WCOT Fused Silica, CP-Cyclodextrin-2,3,6-M-19; 25 m (średnica wewnętrzna 0,25 mm, grubość wypełnienia 0,25 μm).

Optycznie czynne alkohole, otrzymane sposobem według wynalazku, mogą być stosowane w spektroskopii NMR, w asymetrycznej syntezie kwasów 2-aryloksypropionowych - znanych jako regulatory wzrostu - oraz w syntezie związków wchodzących w skład niektórych leków (naproxen).

Przebieg reakcji sposobem według wynalazku przedstawiono na rysunku, gdzie wzory 1, 2.A i 2.B są wzorami ogólnymi - z prochiralnego ketonu (wzór 1) powstaje optycznie czynny alkohol (wzory 2.A i 2.B), będący mieszaniną enancjomeryczną z przewagą jednego z enancjomerów, a wzory 3.A - 26.A i 3.B - 26.B są wzorami związków otrzymywanych w przedstawionych przykładach wykonania.

Przedmiot wynalazku jest bliżej objaśniony w przykładach wykonania.

P r z y k ł a d 1. Do kolby o pojemności 2000 ml z 750 ml pożywki zawierającej 2,5% wagowych ekstraktu maltozowego o składzie: maltoza - 80%, białko - 6%, dekstryny - 2% oraz sole mineralne - 1%, przenosi się ze skosu agarowego, namnożone komórki szczepu *Mikrospora oryzae*. Hodowlę inkubuje się przez 12 dni w temperaturze 27°C, przy ciągłym wstrząsaniu z częstotliwością około 2 s⁻¹. Po tym czasie dodaje się 0,728 g acetofenonu o wzorze 3, rozpuszczonego w 1 ml acetonu. Kolbę z zawartością reagującą z substratem kultury *Nigrospora oryzae* wytrząsa się przez 9 dni. Po upływie tego czasu całość ekstrahuje się sześciokrotnie chloroformem, porcjami po 50 ml. Połączone ekstrakty suszy się bezwodnym siarczanem magnezu a następnie odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskaną mieszaninę rozdziela się w preparatywnej chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym Kieselgel 60, 230 - 400 mesh ASTM (Merck), stosując jako eluent mieszaninę heksan: czterochlorek węgla: aceton w stosunku 75:10:1 a następnie tę samą mieszaninę w stosunku 25:10:1. Uzyskuje się preparatywnie produkt (mieszaninę S - (-) - 1-feniloetanolu o wzorze 4.A i R - (+) - 1-feniloetanolu o wzorze 4.B w ilości 0,35 g, co stanowi 44% wagowych wydajności. $[\alpha]_{D}^{26,2} = -49,3^\circ$, c = 20,3 w etanolu.

Równolegle z chromatograficznym rozdzieleniem preparatywnym mieszaniny poreakcyjnej oznacza się jej skład za pomocą kapilarnego chromatografu gazowego GC Hewlett Packard 5890 przy zastosowaniu kolumny o wypełnieniu chiralnym: WCOT Fused Silica CP-Cyclodextrin-B-2,3,6-M-19, stosując następujący program temperaturowy: 80°C - 2 min. a następnie narost temperatury w tempie 4°C min⁻¹. Na podstawie uzyskanych wyników po-

miaru stwierdzono, że w mieszaninie poreakcyjnej występuje 2% nieprzereagowanego acetonu o wzorze 3 oraz 98% (wydajność chemiczna) optycznie czynnych alkoholi R - (+) - 1-fenyletanolu o wzorze 4.B i S - (-) - 1-fenyletanolu o wzorze 4.A, o czystości enancjomerycznej (ee) 90%, z enancjomerem S w przewadze. Identyfikację obu enancjomerycznych alkoholi uzyskuje się przez porównanie ich czasów retencji z czasem retencji wzorca (alkoholu) otrzymanego na drodze rutynowej redukcji chemicznej substratu (ketonu).

P r z y k ł a d 2 - 12. Hodowlę kultury przygotowuje się tak jak w przykładzie 1 a proces redukcji ketonów prowadzi się według danych przedstawionych syntetycznie w tabeli, gdzie przedstawiono kolejno:

- prochiralne ketony - nazwy chemiczne (kolumna 2),
- mieszaninę enancjomerycznych, optycznie czynnych alkoholi - nazwy chemiczne oraz numery ich wzorów przedstawionych na rysunku (kolumna 3),
- stężenia substratów (kolumna 4),
- czas transformacji, w dniach (kolumna 5),
- wydajność preparatywną, w % oraz nazwę i stosunek składników eluentu (kolumna 6),
- wydajność chemiczną (stosunek ilości substratu do produktu) i skład enancjomeryczny alkoholi, oznaczone metodą chromatografii gazowej na adsorbencie chiralnym, przy podanym programie temperaturowym (kolumny 7 i 8),
- skręcalność właściwą optycznie czynnego alkoholu (kolumna 9). Znak skręcalności jest podstawą do ustalenia absolutnej konfiguracji dla wszystkich otrzymanych alkoholi, po porównaniu z danymi literaturowymi.

W przypadku produktów transformacji: p-nitroacetofenonu o wzorze 9, 2-acetylonaftalenu o wzorze 13, 2-acetylopirydyny o wzorze 17, 4-acetylopirydyny o wzorze 19, tetralonu o wzorze 23 i 4-benzoilopirydyny o wzorze 25 - jednokrotna chromatografia jest niewystarczająca z powodu obecności metabolitów własnych we frakcji zawierającej produkt. Dlatego też chromatografię tę powtarza się dwu- trzykrotnie, aż do osiągnięcia zadawalającego stopnia oczyszczenia produktu. Ponadto, w przypadku produktu transformacji benzoilopirydyny o wzorze 25, podane warunki w GC nie pozwalają na ustalenie składu enancjomerycznego otrzymanych alkoholi o wzorach 26.A i 26.B.

Podane w tabeli oznaczenia składników eluentów (rozpuszczalników) mają następujące znaczenie: A - aceton, B - benzen, C - czterochlorek węgla, Cf - chloroform, H - heksan, I - izopropanol, M - metanol, Om - octan metylu.

6

177 372

Tabela - ciąg dalszy

1	2	3	4	5	6	7	8	8
9	4-acetylopyrydyna wzór 19	1-(4-pirydylo)- etanol wzory 20.A i 20.B	0.73	9	23 1.H:Cl:A: 8:3:1:12 H:Cl:A 2:1:1	28:72	97	$[\alpha]_{D}^{21.8} -60.5^{\circ}, c=13.1, Cf$
10	α, α, α -trifluoro- acetofenon wzór 21	2,2,2-trifluoro-1- fenyloetanol wzory 22.A i 22.B	0.64	10	79 1.H:Cl: 170:153:17 2.H:Cl: 108:1	100° (1 min), a nast. 5°/min	19	$[\alpha]_{D}^{23.8} -14.2^{\circ}, c=21.9, Cf$
11	α -tetralon wzór 23	α -tetralol wzory 24.A i 24.B	0.93	6	27 1.H:Cl:Om 20:20:3 2.H:Cl:Om 10:10:1:1	100° (1 min), a nast. 5°/min	5***	$[\alpha]_{D}^{22.3} -3.54^{\circ}, c=11.3, Cf$
12	4-benzolopirydyna wzór 25	fenylo(4-pirydylo)- metanol wzory 26.A i 26.B	1.68	13	17 H:Cl:A:M 88:2:1	100° (1 min), a nast. 3°/min	-	$[\alpha]_{D}^{22.4} +23.7^{\circ}, c=4.38, E$
						100°, nast. 5°/min. do 200° (15 min.)		

* na podstawie GC, wyrażona jako stosunek substratu do produktu po zakończeniu transformacji,
 ** na podstawie GC,
 *** na podstawie skręcalności.

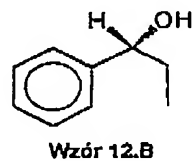
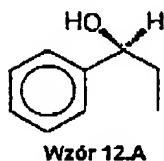
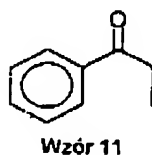
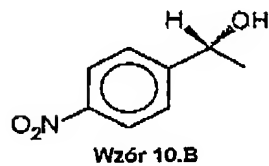
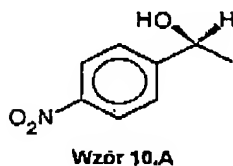
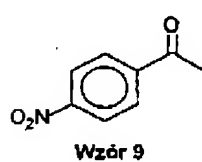
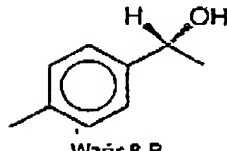
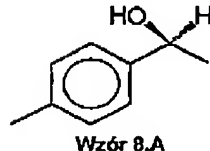
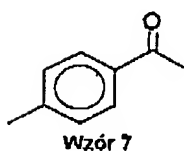
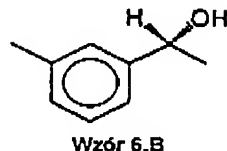
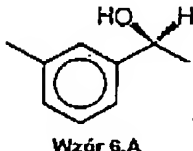
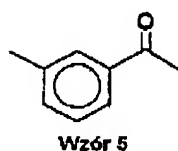
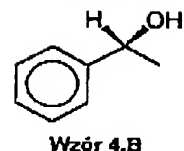
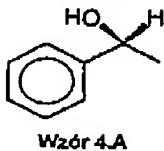
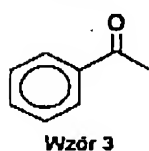
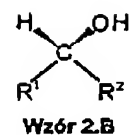
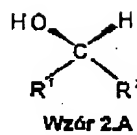
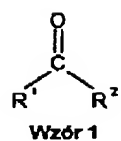
177 372

5

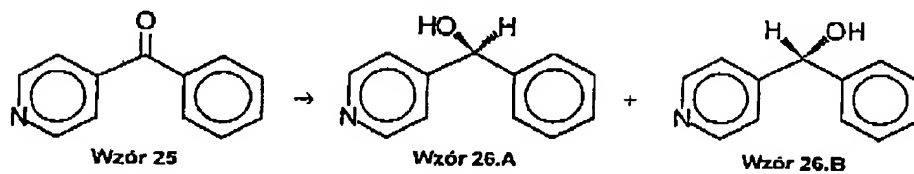
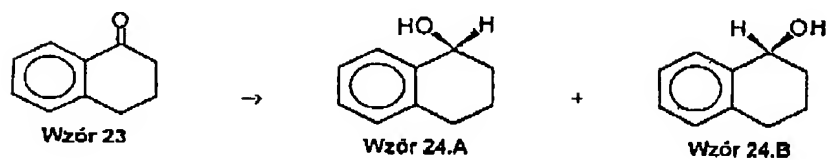
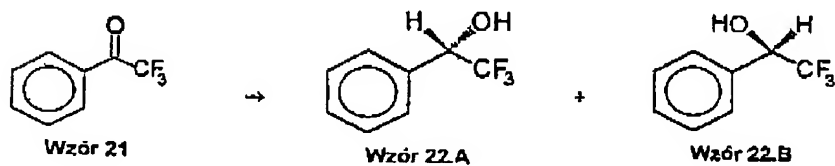
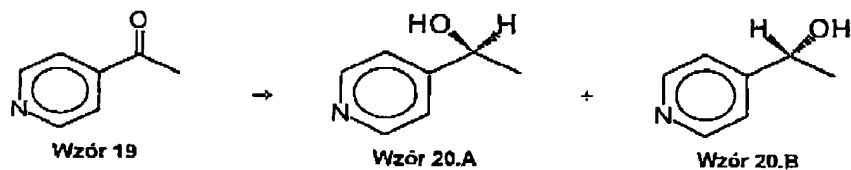
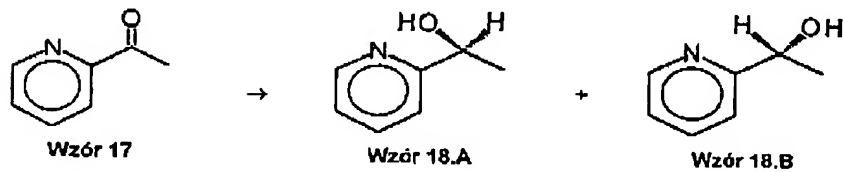
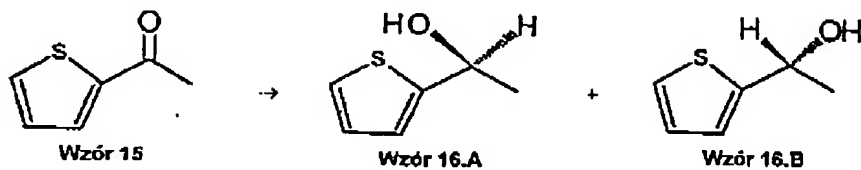
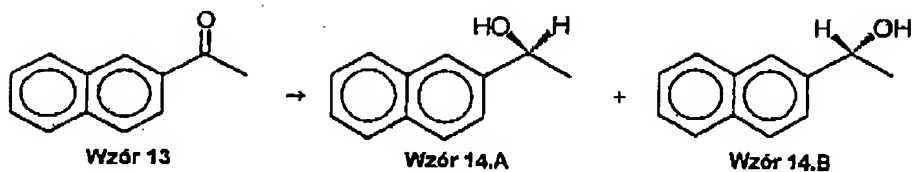
T a b e l a

Nr przyk- ładu	Substrat	Produkt	Stężenie substancji [g/dm ³]	Czas transfor- macji [dni]	Wydajność preparatywna, [%], Eluent w chromatogramie kolumnowej	Wydajność chemiczna		ae [%] mieszaniny alkoholi **	[α] ₅₄₆ (c, g/100ml, rozpuszczalnik)
						Warunki w GC			
1	2	3	4	5	8	7	8	9	
1	acetofenon wzór 3	1-fenyletanol wzory 4.A i 4.B	0.97	9	44 H:C:A 75:10:1	2:98	90		[α] ₅₄₆ ^{26.2} -49.3°, c=20.3, E
2	3-metylo- acetofenon wzór 5	1-(m-tolio)etanol wzory 6.A i 6.B	0.84	7	51 H:C:A 150:10:2:1	80° (2 min), a nast. 4°/min.	9		[α] ₅₄₆ ^{20.6} -47.3°, c=9.48, Cf
3	4-metylo- acetofenon wzór 7	1-(p-tolio)etanol wzory 8.A i 8.B	1.34	8	15 1.H:C:Om 270:40:3, 2.H:C:Om 25:10:1, 3.H:C:Om 174:69:37	27:73	6		[α] ₅₄₆ ^{21.3} -60.8°, c=9.48, Cf
4	4-nitroacetofenon wzór 8	1-(p-nitrofenylo)- etanol wzory 10.A i 10.B	1.52	13	25 H:C:A 180:180:3:2	80° (1 min), a nast. 5°/min.	30		[α] ₅₄₆ ^{23.8} -14.2°, c=21.9, Cf
5	propiofenon wzór 11	1-fenylpropanol wzory 12.A i 12.B	0.54	8	43 H:C:A 15:5:1	8:92	94		[α] ₅₄₆ ^{22.9} -57.8°, c=7.34, H
6	2-acetylnaftalen wzór 13	1-(2-naftylo)etanol wzory 14.A i 14.B	0.15	10	20 H:B:A 8:8:1	80° (1 min), a nast. 5°/min.	10		[α] ₅₄₆ ^{16.2} -5.13°, c=1.17, Cf
7	2-acetyloctofen wzór 15	1-(2-tienylo)etanol wzory 16.A i 16.B	1.87	14	~20 1.H:C:Om 50:50:3 2.H:C:Om 25:25:1:1	140° (15 min), a nast. 2°/min.	13		[α] ₅₄₆ ^{18.3} -20.4°, c=8.62, Cf
8	2-acetylopirydyna wzór 17	1-(2-pirydylo)- etanol wzory 18.A i 18.B	0.72	9	31 1.H:C:A 5:4:1 2.H:C:A 2:1:1	59:41	100		[α] ₅₄₆ ^{21.8} -45.1°, c=19.5, Cf
						80° a nast. 4°/min			

177 372



177 372



Departament Wydawnictw UP RP. Nakład 70 egz.
Cena 2,00 zł.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.